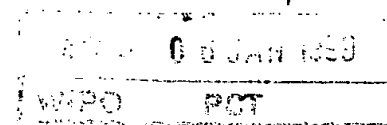


DE 98/3155



**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung**

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts in Heidelberg, Necker/Deutschland  
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs"

am 27. Oktober 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt  
eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue  
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-  
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vor-  
läufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Interna-  
tionalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. November 1998  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wallner

Zeichen: 197 47 418.7

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Unser Zeichen: K 2454 - hu / wd

### Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine  
ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines  
solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des  
Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellprolifera-  
tion und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von Drosophila,  
Xenopus laevis und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von  
sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. Xwnt-8, kodiert sind,  
und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signal-  
weg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Mela-  
nom impliziert (vgl. Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren  
des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei  
Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzu-  
stellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen  
erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-  
Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Amino-  
säure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in

5 Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in *Xenopus laevis* zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cysteinreichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

10

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

20

(a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,

(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder

25

(c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

30

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus *Xenopus laevis*, Maus,

Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-I) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

- 5      Fig. 2.1      (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762  
         Fig. 2.2      (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3  
         Fig. 2.3      (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759  
         ~~Fig. 2.4      (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761~~  
         Fig. 2.5      (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758  
10      Fig. 2.6      (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760  
         Fig. 2.7      (DNA aus *Xenopus laevis*) als pRNdkk-1 unter DSM 11757
- 

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

15      Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer *Xenopus laevis*-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., Mechanisms Develop 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden  
20      zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in *Xenopus laevis* mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei *Xenopus laevis* gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher *Xenopus laevis* mRNA mikroinjiziert wird, die nicht  
25      für (wnt-I) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-I) kodiert. Solch eine mRNA läßt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

30      Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS,

cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

---

10 Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15 Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfigurierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls  
20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw.  
25 monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann  
30 dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-I) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedener Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-I) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-I) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-I) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (wnt-I) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (wnt-I) kodierenden Gens verwendet.

Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen von (wnt-I) beitragen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-I)

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-I) wurde die DNA von Fig. 2.6, phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-I erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-I) (C-Terminuspartner). pQ/wnt-I wurde zur Transformation von

5 E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt.

---

10 Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

15 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

#### Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

20 Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

#### Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

30 Pro Immunisierung wurden 35µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)



Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)  
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)  
Tag 80: Ausbluten

- 5 Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis
- 10 Banden sichtbar waren.
- 15
- 20

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

## 25 Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung wurden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- 30 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

### Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

5

Pro Immunisierung wurden  $12\mu\text{g}$  Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

---

10

- |         |   |
|---------|---|
| Tag 0:  | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)         |
| Tag 28: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 56: | 3. Immunisierung (icFA)                                 |
| Tag 84: | 4. Immunisierung (PBS)                                  |
| Tag 87: | Fusion  |

15

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

### Patentansprüche

- 5      1.    Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.
- 
- 10      2.    Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.
- 10      3.    DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 15      4.    DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:  
        (a)    die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,  
        (b)    eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder  
        (c)    eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
- 20      5.    Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
- 20      6.    Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 25      7.    Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.
- 30      8.    Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 30      9.    Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
-

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des Öffentlichen Rechts  
K 2454

5

### **Zusammenfassung**

### **Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs**

10

---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

I C-----C-C-----C-----CC-----C-G-C

II G-G-C-----DC-G-CCA-----\*-----C-P-----G-C-----\*-----RC-C-GL-C

Fig. 1



Fig. 2 (Forts.)



phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

312 CTGCTAAAGCAATCATCAGAAAGAAACCTGGCAAACTTACCTCCCAAGCTATACACAAATGAGAA  
244 GG6CAAAATAAAGCTGTCAAGTAAACTTTGAAAACTTACCTCCCAAGCTATACACAAATGAGAA  
106 GCCACAGTCC...CAACCAAGGTTCAATCAGCCCTGCAATGGTCTGGTA  
67 GCCACAGTCC...CAACCAAGGTTCAATCAGCCCTGCAATGGTCTGGTA  
329 GCTCCAGCCCAAGCCGCGG6CAAGCCGCGTGGAGGTTGTAAGATCTGGTCTGGTCTGGCC  
314 GCGCTAGTCCCA.CCCCGCGG6AGG6G6ACCGCCG6CCG6T...CAAAATCTGGTCTGGTCTGGCA  
361 GTACACAGTCCCA...GAAACGGCAACTCTGGTCTGGTCTGGTCTGGCAATGGCC

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

372 CCAACACAGACACCGAAGGTTGGAAATAATACCATCCATCCATGTTGACCCGAGAAATTCAGAAAGT  
304 CCAACACAGAAACCAAGAAATGGTAAATAAATGTTGACGACTATCAAGAAATTCAGAAAGT  
148 GGAGGAAAGAAAGAAACGATGGCCACAGAGATGGGATGTTGTTGCCCCGAGTACCCGCTGGAAATTA  
109 GGAGGAAAGAAAGAAACGATGGCCACAGAGATGGGATGTTGTTGCCCCGAGTACCCGCTGGAAATTA  
389 GAAAGCGCAGGAAAGCGCTGGCAATGATGATGTTGCCCCGAGTACCCGCTGGAAATTA  
371 GGAGGCGCCGAAAGCGCTGGCAATGATGATGTTGCCCCGAGTACCCGCTGGAAATTA  
406 GGAGGCGCAGAAAGCGCTGGCAATGATGATGTTGCCCCGAGTACCCGCTGGAAATTA

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

432 T...GATAACAGAACTGGATCAACAAATTTTTCGGAGACAAATTAATACATCTATAAGG  
364 TACAGATCAACAACTGGATCAACAAATTTTTCGGAGACAAATTAATACATCTATAAGG  
208 ATGGAAATCTGGCAATCCCAAGTCACTGAGAGGATCTCTACCCCAACATATCCAG...CTCTGG  
169 ATGGCAATCTGGTAATCCCAAGTCACTGAGAGGATCTCTACCCCAACATATCCAG...CTCTGG  
449 ATGGAAATCTGGCAATCCCAAGTCACTGAGAGGATCTCTACCCCAACATATCCAG...CTCTGG  
431 ATGGAAATCTGGTAATCCCAAGTCACTGAGAGGATCTCTACCCCAACATATCCAG...CTCTGG  
466 ATGGAAATCTGGTAATCCCAAGTCACTGAGAGGATCTCTACCCCAACATATCCAG...CTCTGG

Fig. 2 (Forts.)

433  
424  
265  
226  
500  
479  
526

GTGGAGAAACAAGAAATCATGAGTGATATCATTTGATGAAGACTGTGAACAAGAAAGT  
ATGGCAACCCGGCATAGAGATTCGCAACCAATGGTCACTATTCGAACCATGACCTGGAAAGT  
ATGGTACTCGGCACAGAAATCGAAACCAATCGGTCACTTAACTCAAAACCATGACTTGGAAAGT  
AGGAAGCATCATTTGAAACCCTTGGTAAATGAACCAACCAAGTGGAAAGTGGC  
AGGAAGCCATCACCTGAAGGCTTTGGTAAATGATCAATAGCACCTCCGCCGCGGGGATGGAAATATC  
AGGAAGCCATTCTGGAAAGCTATAATAATGCTGATCTGCTGC...AACAAATGGAACTACCTATT

phdtkk-3  
pcdtkk-3  
pmdtkk-2  
phdtkk-2  
pmdtkk-1  
phdtkk-1  
pRNdtkk-1

433  
484  
325  
286  
560  
533  
583

...  
ATTGCCAGTCTCCACCTTTGAAATACAAAGTGTCTCAGCCCCCTGTAAACCCAGCATATACACACT  
AGAACTCTAGGGAAGGCCCACACACTCCAAAGATGCTCATATATAAAAGGACATGAAAGGAGACCCAT  
AGAACTCTAGGGAAGGCCCACACACACTCCAAAGATGCTCATATATAAAAGGACATGAAAGGAGACCCAT  
CCAAGAGAACCACTGACTTCAAAATATATCACCACCAAGGACCAAGGAGACCCAT  
CCAAGAGAACCACTTGTCTTCAAAATATGTAATCACACCAAAAGGACCAAGGAGACCCAT  
CCAAAATTAAACCAACGTCCTCCCATTTAAAGGACCAAGGAGACCCAT

phdtkk-3  
pcdtkk-3  
pmcdtkk-2  
phdtkk-2  
pmcdtkk-1  
phdtkk-1  
pRNcdtkk-1

433  
544  
385  
346  
620  
593  
643

Fig. 2 (Forts.)

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

433 CTA ACTTCAGAGGAGAAATG. GTACCAATTTGTGAGAAACCAACAATGACTGAAACCCAGGA  
604 TCAGCAAAACCAAGTGCATCCATCAAGGGGAAAGTCTGTATACCAAAACAAACGCAAGAAAGGTTCGC  
445 TCAGCAAAACCAAGTGCATCCATCAAGGGGAAAGTCTGTATACCAAAACAAACGCAAGAAAGGTTCGC  
406 TCAGCAAAACCAAGTGCATCCATCAAGGGGAAAGTCTGTATACCAAAACAAACGCAAGAAAGGTTCGC  
680 TCAGCAAAACCAAGTGCATCCATCAAGGGGAAAGTCTGTATACCAAAACAAACGCAAGAAAGGTTCGC  
653 TCAGCAAAACCAAGTGCATCCATCAAGGGGAAAGTCTGTATACCAAAACAAACGCAAGAAAGGTTCGC  
703 TCAGCAAAACCAAGTGCATCCATCAAGGGGAAAGTCTGTATACCAAAACAAACGCAAGAAAGGTTCGC

433 ACGTGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA  
663 ACGGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA  
505 ACGGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA  
468 ACGGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA  
740 ACGGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA  
713 ACGGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA  
763 ACGGGCTGGAGATTTTCAGAAAGAACTGGCTGTTCCTGTGTGCACTCCGTTACCGGAGAGA

433 GGTGAACCTTGCCATGATCCCTTCAAAACAGACTTCTCAACCTTGATCACTGGGAACTGGGA  
723 AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCACTGATGTCAGAAAGATCTGAT  
565 AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCACTGATGTCAGAAAGATCTGAT  
526 AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCACTGATGTCAGAAAGATCTGAT  
800 AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCACTGATGTCAGAAAGATCTGAT  
773 AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCACTGATGTCAGAAAGATCTGAT  
823 AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCACTGATGTCAGAAAGATCTGAT

Fig. 2 (Forts.)

433 .....  
 783 CCTGATGGAGTACTAGAGCGCTGCCCATGTGCAAGTGGCTTGATCTGGCCCAACCTCAGAGC  
 619 AAACACTG.GAAGAGTCAATCAGTACAGACTGTGAATTTGTGTATTTAATGCAATTAATGAGC  
 580 CACCAATTGAGGAACATCAATTTGCAAGACTGTGAAGTTGTGTATTTAATGCAATTAATGAGC  
 856 ... ACCGACAGTC..TAAATATGATGGACTCTTTTATCTAATAATGCTACGAAATATC  
 829 .....  
 883 CGAG6CCCTACAGAG..CCTGAAGGACCTTCTCTAATAATTAAGCTAATTAAGACTTTGGTAC  
 .....  
 433 .....  
 843 AGCCACAGTACTACATCTGTGTGTGAACCTGTCTCCCAATGAACCCAGGAAACCGAAATAA  
 678 ATGATGGAAACCTGGATTGGAAATGCGGAAGAAATGAGGGATGTGTTAAGAAATGTGGAAAGCAG  
 640 ATGGTGGAAATAAGGTTCAAGATGCGAGAAAGAAAT...GGCTAATAATAAGAAACCGTGAATAAG  
 910 CTTTATGATTTGTGAGCTCAATCCCAAGGATGTAGGAATCTTCAGTGTGTAATTAAGCAT  
 829 .....  
 941 CTGCAATGTTATTTTCTCAGTTTACATGAAGTGTCTCTGCTCTCCCTGAACCCGGAATGCTG  
 .....  
 433 .....  
 903 GAAGATCCCTTGAAACATGGATGAGATGCCATTTATCAGTTTAAATACCCAGAGATAATCTT  
 738 AAGAGGCGAGGACTGAATCAAGTAGAGTCGACAAACCAAGTACTACCAAGTGTGTTCCG  
 697 AATATAGATGATCACAATAAATAAATAAATAAAGATGCGGCCGCAAGCTTATTCCTTTA  
 970 TCCGACAATACTTTCCAAAGCTCTGGAAGTGTAAAGGACTTTGTTCTTGATGGAATCCTCC  
 829 .....  
 1001 CGCAACTGTGTTCTTTTGTGAGGAACTTCCTAATAATTAATGCTAATTAACAGTAAATTA  
 TACTG

phdtk-3  
 pcdtk-3  
 pmdtk-2  
 phdtk-2  
 pmdtk-1  
 phdtk-1  
 pRNdtk-1

phdtk-3  
 pcdtk-3  
 pmdtk-2  
 phdtk-2  
 pmdtk-1  
 phdtk-1  
 pRNdtk-1

phdtk-3  
 pcdtk-3  
 pmdtk-2  
 phdtk-2  
 pmdtk-1  
 phdtk-1  
 pRNdtk-1

Fig. 2 (Forts.)

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

433 .....  
963 TCTGATTACGAAAGCAAGCGTCATTCAGGAAAGTGCGTAAAGAAATTAGAAAGCCCTGGAG  
798 TTATGTCCTCATCTATGTAATAATGTACACATTTGTGAAAATGCTATTATTAAAGAA  
757 GTGAGGGTTAAT.....  
1030 CTGTGATTGCAgTAAATTACGTGTGTGTGTAATCCCTCagTGTGGCACITACCTGTAAATGTC  
829 .....  
1061 TGTTGTAAATACTACGCAAGGAGAGACCCTGTAAAACTGTAAATACCCCGTGTATAGAAAGTG

433 .....  
1023 GACCAAGCAGGTGTGAAGTCTGAGCATGACCCGCTCATGACCTATTCTCTGGGAGATGAA  
858 AGCACACCATGGAAATTACAAA.....  
769 .....  
1090 AgCAAAACCTTTTAATTATTTCTAgAgGTGTgTACATTGCTTGTCTCTTGCATGT  
829 .....  
1121 TACATGATCTTCCTATTGTAACTGACCCTTGACATTCCGACGCTCTTCCCTTT

433 .....  
1083 ATATGAAGTTCAAAACACCAGTTTAGTTAGTCTCCTAGAAATTGTTGCTAGTGTCTTGCCTTA  
882 .....  
769 .....  
1150 aAATTTTTTTtGTaCACCgTTGATtGTCTTGAcTCATAAATATTCTATAATGgAgTAgAA  
829 .....  
1181 TATATATATATATAAATATATATATTATATTATGTAAGATTTACGCTCTAGTATGCTTG

Fig. 2 (Forts.)

433	.....		
1143	CATACACCCCTTAACAGATACCTGCTGGATAGAGTGCAATAAACATCTTCATTCAGCATCC	phdkk-3	
882	.....	pcdkk-3	
769	.....	pmdkk-2	
1210	AAAAAAAAAAAAAAAAA	phdkk-2	
829	.....	pmdkk-1	
1241	TATTTTAAATTGAATATAAACATTTCTAAACTTAAACCAAAAAAAAAAAAA	phdkk-1	
		pRNdkk-1	
433	.....		
1203	GTITTCGTGCACCAACCTGCAATGTTCAAAATTCATGTGGAATTCACCTCAATCTTTGGACCC	phdkk-3	
882	.....	pcdkk-3	
769	.....	pmdkk-2	
1227	.....	phdkk-2	
829	.....	pmdkk-1	
1298	.....	phdkk-1	
		pRNdkk-1	
433	.....		
1263	AAACTTTCATCAAGACAAATGAGAAAGCATCAGTGTTCCTTTGGATTATTCCTTTC	phdkk-3	
882	.....	pcdkk-3	
769	.....	pmdkk-2	
1227	.....	phdkk-2	
829	.....	pmdkk-1	
1298	.....	phdkk-1	
		pRNdkk-1	

Fig. 2 (Forts.)

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

phdkk-3  
pcdkk-3  
pmdkk-2  
phdkk-2  
pmdkk-1  
phdkk-1  
pRNdkk-1

433 .....  
1323 CTTGTACAGCAGAAATAAACGTATCAGTACTCGTACTCATTAAAAAACACACGGAGCA  
882 .....  
769 .....  
1227 .....  
829 .....  
1298 .....

433 .  
1383 T  
882 .  
769 .  
1227 .  
829 .  
1298 .

Fig. 2 (Forts.)

